

PCT/JP 00/03029

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

11.05.00

10/009877

JPO0/03029

REC'D 03 JUL 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 5月12日

4

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第131978号

出願人

Applicant(s):

宮田 敏男
黒川 清

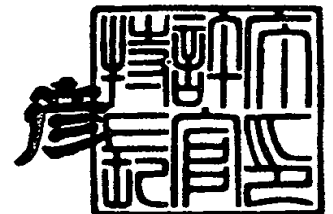
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月16日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3045041

【書類名】 特許願

【整理番号】 KRK-105

【提出日】 平成11年 5月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61M 1/14

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101

 【氏名】 宮田 敏男

【特許出願人】

 【識別番号】 597142376

 【氏名又は名称】 宮田 敏男

【特許出願人】

 【識別番号】 597142387

 【氏名又は名称】 黒川 清

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 041092

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血中カルボニル化合物トラップ剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 血中のカルボニル化合物を除去するための、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体。

【請求項 2】 血液透析に用いるための、請求項 1 に記載の担体。

【請求項 3】 担体が透析膜である、請求項 2 に記載の担体。

【請求項 4】 透析膜がポリスルホン膜である、請求項 3 に記載の担体。

【請求項 5】 カルボニル化合物トラップ剤がアミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、または SH 基含有化合物、あるいはそれらの誘導体である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の担体。

【請求項 6】 カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の担体。

【請求項 7】 カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする、血中のカルボニルストレス状態改善剤。

【請求項 8】 血液回路内に固定化するための、請求項 7 に記載のカルボニルストレス状態改善剤。

【請求項 9】 カルボニル化合物トラップ剤がアミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、または SH 基含有化合物、あるいはそれらの誘導体である、請求項 7 または 8 に記載のカルボニルストレス状態改善剤。

【請求項 10】 カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、請求項 7 または 8 に記載のカルボニルストレス状態改善剤。

【請求項 11】 患者血液を血液回路内においてカルボニル化合物トラップ剤に接触させる工程を含む、カルボニルストレス状態の改善方法。

【請求項 12】 カルボニル化合物トラップ剤が担体に固定化されていることを特徴とする、請求項 11 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血中のカルボニル化合物の除去に関する。具体的には、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を用いる、血中のカルボニル化合物の除去に関する。

【0002】

【従来の技術】

血液透析は慢性腎不全患者に対して一般的に行われる治療であり、半透膜を介して血液と透析液が接触することにより、血中の老廃物や毒性物質が除去される。しかし、腎不全の病態は、透析により完全に食い止められるものではない。そのような病態として、腎不全患者におけるAGE (advanced glycation end products) のレベルの上昇が挙げられる。AGEは、タンパク質を構造的および機能的に修飾し、透析アミロイドーシスや動脈硬化などの透析合併症の発症に貢献する (Makita Z, et al. N Engl J Med 325: 836-842, 1991; Miyata T, et al. J Clin Invest 93: 521-528, 1994)。腎不全では血漿中のカルボニルAGE前駆体の蓄積 (いわゆるカルボニルストレス) により、AGE産物レベルが上昇することが、近年明らかにされた (Miyata T, et al. J Am Soc Nephrol 9: 2349-2356, 1998; Miyata T, et al. Kidney Int 55: 389-399, 1999)。これらのさまざまなカルボニル中間体は、炭水化物および脂質に由来する (Miyata T, et al. Kidney Int 55: 389-399, 1999; Miyata T, et al. Kidney Int 54: 1290-1295, 1998; Miyata T, et al. Kidney Int 51: 1170-1181, 1997)。腎不全患者における、これらAGEやカルボニル中間体のレベルの上昇、すなわち、「カルボニルストレス」は、現行の血液透析では有効に除去することはできない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、血中のカルボニル化合物を除去するためのカルボニル化合物トラップ剤が固定化された担体を提供することを課題とする。また、本発明は、血中のカルボニルストレス状態を改善するための方法および薬剤の提供を課題としている。本発明により、特に血液透析患者において、カルボニル化合物による障害を防止することが可能となる。血液透析患者のカルボニル化合物による障害をできるだけ小さくすることが本発明の課題である。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、まず、血液透析に使用される血液透析膜が、患者血中のカルボニル化合物量にどのような影響を及ぼすのかを検討した。カルボニル前駆体（カルボニルストレス）を表すマーカーであるペントシジンの血中含量を、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により定量し、患者が透析に使用している透析膜の種類別に比較した。その結果、遊離ペントシジンは、いずれの透析膜を使用した場合でも透析により顕著に除去されるものの、体内のペントシジンの大半を占める蛋白結合型ペントシジンは、透析によっては効果的に除去できていないことが判明した。

【0005】

透析膜の種類別では、low-fluxセルロース、high-fluxポリメチルメタクリレート（PMMA）、およびAN69においては、蛋白結合型および遊離型ペントシジンは、両者とも同様の値を示したが、high-fluxポリスルフォン（PS）においては低い値を示した（ $p < 0.01$ ）。患者が日本人であるかベルギー人であるか、またはPS膜のメーカーなどで差は認められなかった。患者が使用する透析膜をAN69からPSに変更した3人の患者では、蛋白結合型ペントシジンのレベルが低下し、再びAN69に戻すと、もとのレベルまで上昇した。これらの結果から、カルボニル化合物の生成を抑制するための透析膜としては、ポリスルフォン膜が有効であることが判明した。

【0006】

本発明者は次に、血中のカルボニル化合物をより効果的に除去するため、カルボニル化合物トラップ剤を利用することを考えた。透析患者血液から血漿を調製し、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体と共にインキュベートし、血中カルボニル化合物量の定量を行った。その結果、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体とのインキュベーションにより、血中カルボニル化合物量は有意に低下することが判明した。

【0007】

このようなことから、本発明者は、血中に蓄積するカルボニル化合物をより重

視し、タンパク質修飾を中心とした透析患者のカルボニルストレスを改善することが有用であり、前記課題の達成のためにカルボニル化合物との化学的な反応や吸着によってカルボニル化合物のタンパク質に対する修飾活性を失わせる、または低下させる化合物を固定化した担体の利用が有効であることを見出し本発明を完成した。本発明において、このような化合物を「カルボニル化合物トラップ剤」と呼ぶ。

【0008】

すなわち本発明は、血中のカルボニル化合物を除去するための、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体、および血中のカルボニルストレス状態を改善するための方法および薬剤に関し、より具体的には、

〔1〕血中のカルボニル化合物を除去するための、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体、

〔2〕血液透析に用いるための、〔1〕に記載の担体、

〔3〕担体が透析膜である、〔2〕に記載の担体、

〔4〕透析膜がポリスルホン膜である、〔3〕に記載の担体、

〔5〕カルボニル化合物トラップ剤がアミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、またはSH基含有化合物、あるいはそれらの誘導体である、〔1〕から〔4〕のいずれかに記載の担体、

〔6〕カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、〔1〕から〔4〕のいずれかに記載の担体、

〔7〕カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする、血中のカルボニルストレス状態改善剤、

〔8〕血液回路内に固定化するための、〔7〕に記載のカルボニルストレス状態改善剤、

〔9〕カルボニル化合物トラップ剤がアミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、またはSH基含有化合物、あるいはそれらの誘導体である、〔7〕または〔8〕に記載のカルボニルストレス状態改善剤、

〔10〕カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、〔7〕または〔8〕に記載のカルボニルストレス状態改善剤、

〔11〕患者血液を血液回路内においてカルボニル化合物トラップ剤に接触させる工程を含む、カルボニルストレス状態の改善方法、

〔12〕カルボニル化合物トラップ剤が担体に固定化されていることを特徴とする、〔11〕に記載の方法、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明において、トラップの対象となるカルボニル化合物とは、例えば腎不全患者の血中に酸化ストレスにともなって蓄積する以下のような化合物が含まれる。

【0010】

炭水化物に由来するカルボニル化合物：

- ・アラビノース
- ・グリオキサル
- ・メチルグリオキサル
- ・3-デオキシグルコゾン

アスコルビン酸に由来するカルボニル化合物：

- ・デヒドロアスコルビン酸

脂質に由来するカルボニル化合物：

- ・ヒドロキシノネナール
- ・マロンジアルデヒド
- ・アクロレイン

【0011】

本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤としては、これら全てのカルボニル化合物に対し、化学的な反応や吸着によってカルボニル化合物のタンパク質に対する修飾活性を失わせる、または低下させるものであることが望ましいが、これらのカルボニル化合物の中で主要なもののみに対して有効な場合も含まれる。本発明において使用することができるカルボニル化合物トラップ剤には、例えば以下のようなものが含まれる。

【0012】

・ アミノグアニジン (Foote, E. F. et al., Am. J. Kidney Dis., 25: 420-425 (1995))

・ ± 2 -イソプロピリデネヒドラゾノ-4-オクソ-チアゾリジン-5-イルアセタニリド (± 2 -isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide: OPB-9195) (S. Nakamura, 1997, Diabetes. 46: 895-899)

【 0 0 1 3 】

さらにカルボニル化合物トラップ剤としては、例えば以下のような化合物またはそれらの誘導体であって、カルボニル化合物トラップ剤として機能する化合物を用いることができる。なお、誘導体とは、化合物のいずれかの位置で原子または分子の置換が起きている化合物を指す。

【 0 0 1 4 】

(1) メチルグアニジンなどのグアニジン誘導体 (特開昭 6 2 - 1 4 2 1 1 4 号、特開昭 6 2 - 2 4 9 9 0 8 号、特開平 1 - 5 6 6 1 4 号、特開平 1 - 8 3 0 5 9 号、特開平 2 - 1 5 6 号、特開平 2 - 7 6 5 号、特開平 2 - 4 2 0 5 3 号、特開平 6 - 9 3 8 0 号、特表平 5 - 5 0 5 1 8 9 号)。

(2) スルホニルヒドラジンなどのヒドラジン誘導体。

(3) ピラゾロン (特開平 6 - 2 8 7 1 7 9 号)、ピラゾリン (特開平 1 0 - 1 6 7 9 6 5 号)、ピラゾール (特開平 6 - 1 9 2 0 8 9 号、特開平 6 - 2 9 8 7 3 7 号、特開平 6 - 2 9 8 7 3 8 号)、イミダゾリジン (特開平 5 - 2 0 1 9 9 3 号、特開平 6 - 1 3 5 9 6 8 号、特開平 7 - 1 3 3 2 6 4 号、特開平 1 0 - 1 8 2 4 6 0 号)、ヒダントイン (特開平 6 - 1 3 5 9 6 8 号) などの 2 個の窒素原子を有する 5 員複素環式化合物。

(4) トリアゾール (特開平 6 - 1 9 2 0 8 9 号) などの 3 個の窒素原子を有する 5 員複素環式化合物。

(5) チアゾリン (特開平 1 0 - 1 6 7 9 6 5 号)、チアゾール (特開平 4 - 9 3 7 5 号、特開平 9 - 5 9 2 5 8 号)、チアゾリジン (特開平 5 - 2 0 1 9 9 3 号、特開平 3 - 2 6 1 7 7 2 号、特開平 7 - 1 3 3 2 6 4 号、特開平 8 - 1 5 7 4 7 3 号) などの 1 個の窒素原子と 1 個の硫黄原子を有する 5 員複素環式化合物。

(6) オキサゾール (特開平 9-59258 号) などの 1 個の窒素原子と 1 個の酸素原子を有する 5 員複素環式化合物。

(7) ピリジン (特開平 10-158244 号、特開平 10-175954 号)、ピリミジン (特表平 7-500811 号) などの含窒素 6 員複素環式化合物。

(8) インダゾール (特開平 6-287180 号)、ベンゾイミダゾール (特開平 6-305964 号)、キノリン (特開平 3-161441 号) などの含窒素縮合複素環式化合物。

(9) ベンゾチアゾール (特開平 6-305964 号) などの含硫含窒素縮合複素環式化合物。

(10) ベンゾチオフェン (特開平 7-196498 号) などの含硫縮合複素環式化合物。

(11) ベンゾピラン (特開平 3-204874 号、特開平 4-308586 号) などの含酸素縮合複素環式化合物。

(12) カルバゾイル (特開平 2-156 号、特開平 2-753 号)、カルバジン酸 (特開平 2-167264 号)、ヒドラジン (特開平 3-148220 号) などの窒素化合物。

(13) ベンゾキノン (特開平 9-315960 号)、ヒドロキノン (特開平 5-9114 号) などのキノン類。

(14) 脂肪族ジカルボン酸 (特開平 1-56614 号、特開平 5-310565 号)。

(15) ケイ素含有化合物 (特開昭 62-249709 号)。

(16) 有機ゲルマニウム化合物 (特開平 2-62885 号、特開平 5-255130 号、特開平 7-247296 号、特開平 8-59485 号)。

(17) フラボノイド類 (特開平 3-240725 号、特開平 7-206838 号、特開平 9-241165 号、WO94/04520)。

(18) アルキルアミン類 (特開平 6-206818 号、特開平 9-59233 号、特開平 9-40626 号、特開平 9-124471 号)。

(19) アミノ酸類 (特表平 4-502611 号、特表平 7-503713 号)。

(20) アスコクロリン (特開平 6-305959 号)、安息香酸 (WO91/1

1997)、ピロロナフチリジニウム(特開平10-158265号)などの芳香族化合物。

- (21)ポリペプチド(特表平7-500580号)。
- (22)ピリドキサミンなどのビタミン類(WO97/09981)。
- (23)グルタチオンなどのSH基含有化合物。
- (24)還元型アルブミンなどのSH基含有蛋白。
- (25)テトラサイクリン系化合物(特開平6-256280号)。
- (26)キトサン類(特開平9-221427号)。
- (27)タンニン類(特開平9-40519号)。
- (28)第4級アンモニウムイオン含有化合物。

【0015】

以上のような化合物は、一般にメイラード反応阻害剤として知られている。メイラード反応とは、グルコースなどの還元糖とアミノ酸やタンパク質との間に生じる非酵素的な糖化反応であり、1912年にメイラード(Maillard)がアミノ酸と還元糖の混合物を加熱すると褐色に着色する現象に注目して報告した(Maillard, L. C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599 (1912))。このメイラード反応は、食品の加熱処理や貯蔵の間に生じる褐変、芳香成分の生成、呈味、タンパク質変性などに関与していることから、食品化学の分野で研究が進められてきた。

【0016】

ところが、1968年ヘモグロビンの微小画分であるグリコシルヘモグロビン(HbA1c)が生体内で同定され、さらにこれが糖尿病患者において増加することが判明し(Rahbar, S., Clin. Chim. Acta, 22: 296(1968))、それを契機に生体内におけるメイラード反応の意義並びに糖尿病合併症、動脈硬化などの成人病の発症や老化の進行との関係が注目されるようになってきた。そして、このような生体内のメイラード反応を阻害する物質の探索が精力的に行われ、前述の化合物類がメイラード反応阻害剤として見いだされた。

【0017】

しかし、このようなメイラード反応阻害剤が、血中由来のカルボニル化合物を排除して血液透析患者等のカルボニルストレス状態を改善することができるとい

うことは知られていなかった。

【0018】

本発明におけるカルボニル化合物のトラップ剤を固定化する担体としては、人体に対して無害なもの、血液に直接接触する材料として安全性および安定性を有するものであれば特に制限はなく、例えば、合成または天然の有機高分子化合物や、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭などの無機材料、およびこれらの表面に多糖類、合成高分子などをコーティングしたものなどが挙げられる。

【0019】

高分子化合物からなる担体としては、例えば、ポリメチルメタクリレート系重合体、ポリアクリロニトリル系重合体、ポリスルホン系重合体、ビニル系重合体、ポリオレフィン系重合体、フッ素系ポリマー系重合体、ポリエステル系重合体、ポリアミド系重合体、ポリイミド系重合体、ポリウレタン系重合体、ポリアクリル系重合体、ポリスチレン系重合体、ポリケトン系重合体、シリコン系重合体、セルロース系重合体、キトサン系重合体などがあげられる。具体的には、アガロース、セルロース、キチン、キトサン、セファロース、デキストラン等の多糖類およびそれらの誘導体、ポリエステル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、ポリアリルエーテルスルホン、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸エステル、ポリカーボネート、アセチル化セルロース、ポリアクリロニトリル、ポリエチレンテレフタレート、ポリアミド、シリコン樹脂、フッ素樹脂、ポリウレタン、ポリエーテルウレタン、ポリアクリルアミド、それらの誘導体などが挙げられる。これらの高分子材料は単独、あるいは2種以上を組み合わせ使用され得る。2種以上組み合わせる場合は、そのうち少なくとも1種にカルボニル化合物トラップ剤が固定化される。固定化されるカルボニル化合物トラップ剤は、単独で固定化するほか、2種類以上を固定化してもよい。

【0020】

担体の形状に制限はなく、例えば膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状などがあげられる。これらの担体は、厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、および／または大きさを種々変えることにより、血液との接

触面積を制御することができる。

【0021】

上記担体にカルボニル化合物トラップ剤を固定化するには、公知の方法、例えば、物理的吸着法、生化学的特異結合法、イオン結合法、共有結合法、グラフト化などを用いればよい。また必要によりスペーサーを担体とカルボニル化合物トラップ剤の間に導入してもよい。トラップ剤に毒性がある場合など、担体からの溶出が問題となる場合には、溶出量をできるだけ少なくするためにトラップ剤は担体に共有結合で固定化されていることが好ましい。カルボニル化合物トラップ剤を担体に共有結合するには、担体に存在する官能基を用いればよい。官能基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシ基、チオール基、ヒドロキシ基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、サクシニルイミド基等が挙げられるが、これらに制限されない。共有結合の例としてエステル結合、エーテル結合、アミノ結合、アミド結合、スルフィド結合、イミノ結合、ジスルフィド結合等が挙げられる。

【0022】

カルボニル化合物トラップ剤が固定化された担体としては、例えば、スルホニルヒドラジン基を有するポリスチレン担体（PS-TsNHNH₂, ARGONAUT TECHNOLOGIES社）などの市販のものを用いることもできる。

【0023】

本発明のカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体の滅菌は、公知の滅菌法から、トラップ剤や担体などの種類により適当な滅菌法が選択される。滅菌処理には高圧蒸気滅菌、ガンマ線照射滅菌、ガス滅菌などが挙げられる。

【0024】

カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体と血液との接触は、種々の形態が考えられる。例えば、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体が充填された血液バッグに採血した患者の血液を入れ、この中で患者血液のカルボニル化合物をトラップする方法、カルボニル化合物トラップ剤を固定化したビーズ状、または繊維状等の担体をカラムに充填したものに血液を循環させる方法、などが挙げられる。血液は、全血でなくても、血漿を分離したのち、血漿を処理しても

よい。処理された血液は患者に戻されるか、必要に応じて血液バッグ中などに保存することもできる。血液バッグ内にカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を含めておくことにより、保存中に生成・蓄積するカルボニル化合物をトラップすることも可能である。

【0025】

本発明のカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体と血液との接触は、血液透析や血液濾過、血液濾過透析、血液吸着、血漿分離を含む血液浄化の過程で行うことができる。

【0026】

例えば、血液透析患者に対しては、血液透析回路内にカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を配置させることにより、血液透析とカルボニル化合物のトラップとを同時に行うことができる。この場合、カルボニル化合物トラップ剤を血液透析膜に固定化しておくことが好ましい。担体として用いられる透析膜の種類は公知のものを使用することができる。例えば、再生セルロース、セルローストリアセテート等のセルロース誘導体、ポリメチルメタクリレート、ポリオレフィン、ポリスルホン、ポリアクリロニトリル (PAN)、ポリアミド、ポリイミド、ポリエーテルナイロン、シリコン、ポリエステル系共重合体等が挙げられ、特に限定されない。実施例に示されたように、透析膜としてポリスルホンを用いた場合に、カルボニル前駆体 (ペントシジン) レベルの低下が認められた。従って、上記透析膜の中でも、特にポリスルホン膜を担体として用いるのが好ましい。もちろん透析膜を担体とせず、上記のように、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を充填したカラムを血液透析回路中に配置させてもよい。このように患者血液をカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体に接触させることにより、血中由来のカルボニル化合物が捕捉され、その生体に対する障害活性がうばわれ、無害化される。体外循環時に血液の凝固を防ぐため、抗凝固剤を併用することもできる。抗凝固剤としては、例えば、ヘパリン、低分子ヘパリン、フサン等が挙げられる。これらは、担体に固定化されていてもよい。

【0027】

血液との接触時に用いるトラップ剤が少ないと、透析時に患者血中のカルボニ

ル化合物を処理することができなくなるケースが予想される。特に患者血中のカルボニル化合物の量をあらかじめ予測することは困難なので、患者に対する安全性を保障できる範囲内でできるだけ多量のトラップ剤が活性を維持できるようにするのが効果的である。トラップ剤の用量は、担体へのトラップ剤の固定化量、またはトラップ剤が固定化された担体の使用量を変更して調整することができる。

【0028】

本発明のカルボニル化合物トラップ剤には、上述のメイラード反応阻害剤に代表される有機化合物の他、イオン交換樹脂などの高分子化合物、あるいは活性炭やシリカゲル、アルミナ、炭酸カルシウムなどの無機化合物も使用できる。これらの化合物は、クロマトグラフィーの充填剤として知られているものであるが、その吸着能を利用してカルボニル化合物をトラップすることができる。このような化合物は、それ自体が担体として機能するため、例えば、外部血液循環回路に装置された濾過器内に充填して使用することができる。このような化合物も、本発明によるカルボニルストレス状態改善剤を構成する「カルボニル化合物トラップ剤」として利用することができる。この場合、これらの化合物そのものが、前記カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体として機能する。

【0029】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0030】

【実施例1】 血漿ペントシジンに及ぼす血液透析膜の種類の影響

1. 患者

ベルギー人(n=29)または日本人(n=97)で、週3回の血液透析を行っている患者126名(男性69名、女性57名)を調査した。年齢は 61.2 ± 13 (標準偏差) 歳であった。2名のみが、軽いII型糖尿病であった。すべての患者は、少なくとも3ヶ月間(または、2、3名の患者は3ヶ月以内であるが、血液透析の開始以来)にわたって同じ種類の血液透析膜を使用していた。ベルギー人患者29名中26名におい

ては、透析膜を再使用したが、日本人患者においては、再使用はなかった。各患者のカルテから、残存腎機能(ml/day)、透析膜表面積、および血液透析の透析時間のデータを得た。

【0031】

2. 膜の種類

血液透析膜は、high-flux (UF インデックス $>10\text{ml/mmHg/h}$) AN69 (Hospal (France) 社製) (AN69群)、high-fluxポリスルホン (Fresenius (Germany) 社製) (PS群)、high-fluxポリスルホン (旭メディカル (Japan) 社製) (APS群)、high-fluxポリメチルメタクリレート (polymethylmethacrylate) (Toray (Japan) 社製) (PMMA群)、およびlow-fluxセルロース (旭メディカル (Japan) 社製) (セルロース群) を使用した。

【0032】

3. 血漿試料

血漿試料は、1回目の血液透析開始に先立って126名の患者全員から採取し、毎週の透析後に66名から採取した。

すべての試料は直ちに遠心分離を行い、 -20°C に凍結した血漿について下記の検査をおこなった。

【0033】

4. 全ペントシジンおよび遊離ペントシジンの定量

全ペントシジンの定量は、試料($50\mu\text{l}$)を凍結乾燥させ、 $100\mu\text{l}$ の6N HClに溶解させ窒素封入後 110°C で16時間インキュベートし、 $100\mu\text{l}$ の5N NaOHおよび $200\mu\text{l}$ の0.5M リン酸バッファー(pH7.4)で中和後、孔径 $0.5\mu\text{m}$ のフィルターで濾過し、PBSで20倍に希釈した。遊離型ペントシジンの定量は、試料($50\mu\text{l}$)に等量の10% TCAを混合後、 $5000\times g$ 10分で遠心した。上清を孔径 $0.5\mu\text{m}$ のフィルターで濾過し、蒸留水で4倍に希釈した。

これらの試料中のペントシジンをC18逆相カラム (Waters, Tokyo, Japan) を用いた逆相HPLC (Miyata T, et al. J Am Soc Nephrol 7: 1198-1206, 1996) で分析した。蛍光検出器 (RF-10A; Shimadzu) を用い、励起波長/検出波長を335/385nmで流出液をモニターした。合成ペントシジンを用いて標準曲線を作成した

。蛋白結合型ペントシジン（ペントシジン/蛋白）（ pmol/mg protein ）は、 $[\text{血漿全ペントシジン（pmol/ml）}-\text{遊離ペントシジン（pmol/ml）}]/[\text{血漿蛋白濃度（mg/ml）}]$ により算出した。

【0034】

5. 患者群間の統計解析

ペントシジンレベルの定量の結果を含む各数値は平均±標準偏差またはパーセンテージ（％）として表した。残存腎機能のデータはlog変換した。一元配置分散分析（one-way ANOVA）（F検定つき）により、個人データとペントシジンレベルを、異なる透析膜を用いている血液透析患者のグループ間で比較した。さらに Bonferroni t-testを用いて透析膜のグループを比較分析した。カイ二乗検定により、残存腎機能の程度を、さまざまな群間で比較した。

【0035】

5群の患者間のcross-sectionalな解析の結果を表1に示す。年齢に関してはグループ間に大きな違いはなかった。血漿蛋白レベルはAN69およびセルロース群ではより高かった。透析膜面積はAPS群において大きく、また研究前の血液透析期間・1回の透析時間もAPS群で長かった。一方、残存腎機能はPS群で高かった。

【0036】

【表1】

異なる透析膜で透析を行った5つの患者群の結果						
	APS n=29	PS n=28	AN69 n=15	PMMA n=25	セルロース n=29	ANOVA P 値
年齢(歳)	58±12	61±13	64±7	61±13	64±16	NS
血液透析の期間(年)	13.7±7.5 α	5.4±6.8	7.8±6.7	9.2±6.5	5.5±4.4	<.001
血漿蛋白レベル(g/dl)	6.7±0.5**	6.3±0.7	6.8±0.6	6.2±0.3*	7.0±0.4***	<.001
血漿アルブミンレベル(g/dl)	3.9±0.3 \diamond	3.6±0.4 \diamond	3.9±0.4 Δ	3.6±0.3	4.2±0.3***	<.001
血液透析の透析時間(時間)	4.5±0.23 β	3.98±0.40	4.13±0.23	4.04±0.48	4.00±0.00	<.001
血液透析膜の表面積(m ²)	1.8	1.28±0.36	1.42±0.34	1.31±0.32	1.32±0.24	ND \neq
残存腎機能(ml/day)						
ジオメトリック平均(SD)	47(10)	213(250) \bullet	34(13)	47(8)	26(8)	<.001
(レンジ)	(0-800)	(0-3050)	(0-500)	(0-400)	(0-400)	
残存腎機能(%) \S	33%	50% \bullet	20%	28%	17%	chi2 P 値 <.0001

***: p<0.001でPS群およびPMMA群に対し有意

** : p<0.001でPMMA群に対し有意

* : p<0.05でAN69群に対し有意

\diamond : p<0.05でAPS群に対し有意

\diamond : p<0.01でPMMA群およびセルロース群に対し有意

Δ : p<0.05でセルロース群に対し有意

α : p<0.01で他のすべての群に対し有意

β : p<0.001で他のすべての群に対し有意

\bullet : p=0.05でセルロース群に対し有意

\neq : 透析膜の表面積は患者により固定されているので変数とは考えることはできない。
従って統計学的検定により比較することはできない。

\S : 無尿でない患者の割合

【0037】

透析前の蛋白結合型ペントシジンおよび遊離型ペントシジンの血漿レベルは、AN69、PMMA、およびセルロース群では同じレベルであり、PS群およびAPS群では有意に低かった。PS群とAPS群との間では有意差はなかった(表2)。

【0038】

【表 2】

膜の違いによる5群における透析前のペントシジンレベル					
	APS n=29	PS n=28	AN69 n=15	PMMA n=25	セルロース n=29
ペントシジン/蛋白 (pmol/mg protein)	18.2±4.8	15±6.1	25.4±8.4**	23.2±9.3**	21.7±6.3**
遊離ペントシジン (pmol/ml)	32.4±11.3	41.4±22.9	76.4±28.5**	68.8±26.7**	53.7±18.2**
					ANOVA P 値
					<.001
					<.001

** : p<0.01でPS群およびAPS群に対し有意

【0039】

透析前の血漿ペントシジンに対し影響を与えうる様々な因子を、単変量分析により分析した結果、残存腎機能が、蛋白結合型および遊離ペントシジンに対し有意に影響を与えることが判明した。具体的には、残存腎機能が低いほど、ペントシジンレベルは低かった。血漿蛋白レベルやアルブミンレベル・年齢・透析歴は、ペントシジンレベルと相関は認められなかった(表3)。ポリスルホン群(P S群およびAPS群)の場合、Fresenius社または旭メディカル社(Asahi社)のポリスルホン膜による透析を受けたベルギー人患者または日本人患者の透析前のペントシジンレベルは同様の値を示した(表4)。

【0040】

【表3】

一変数分析によるペントシジンレベルと潜在説明継続変数との関係:r値					
	log (残存腎機能)	全蛋白	アルブミン	年齢	透析歴
ペントシジン/蛋白	-0.28	-0.08	0	0.14	0.03
遊離ペントシジン	-0.36	0.01	-0.12	0.15	0.02

** : p<0.01で有意
*** : p<0.001で有意

【0041】

【表4】

ポリスルホン群中におけるポリスルホンのメーカー および/または患者の国別のペントシジンレベルと残存腎機能				
	Fresenius ベルギー人	Fresenius 日本人	Asahi 日本人	P値
ペントシジン/蛋白 (pmol/mg protein)	14.6±6.2	15.3±6.3	16.2±4.8	NS
遊離ペントシジン(pmol/ml)	37.3±19.6	45.4±25.9	32.4±11.3	NS
残存腎機能 (ml/day)	938(23)	49(14)	47(10)	0.004

【0042】

以上のように、ポリスルホン透析膜を使用する透析患者は、他の透析膜による透析患者よりもペントシジンレベルが低いことが判明した。ポリスルホン膜で透析を行った患者は、国に関わらずペントシジンレベルの低下が認められ、さらに異なるメーカーの透析膜でも同様の結果が得られた。更に、旭メディカル社製ポリスルホン透析膜による透析を受ける患者は、実質的に無尿であるにもか

かわらず、ペントシジンレベルは同様に低かった。Fresenius社製ポリスルフォン群では、尿量が300ml/minを超える患者を除外してもペントシジンレベルの差異における統計学的な有意性に変化は来さなかった。

【0043】

AN69もhigh-fluxであり、また、high-fluxのAN69とlow-fluxのセルロースによる透析が、透析前のペントシジンレベルに関して同様の結果を示したことから、ペントシジンレベルの差異と透析膜の除去性能は無関係であると考えられる。

【0044】

蛋白補正ペントシジンレベルおよび遊離ペントシジンレベルと残存腎機能との関係を、線形回帰分析により分析した。従属変数（蛋白補正ペントシジンレベル・遊離ペントシジンレベル）に対する各説明変数の効果を、変数選択一重回帰分析（変数増加法）（Forward stepwise multiple regression analysis）により検定した。すべての分析は、BMDP統計ソフトウェア（BMDPは New System Professional Edition: Statistical Solutions Inc., University of California Press, Berkeley, 1995 の商標）を用いて行った。P<0.05を有意とした。

【0045】

分析の結果、透析膜の種類と残存腎機能のみが、蛋白結合型および遊離ペントシジンレベルの独立決定因子であることが示された（表5）。相互作用はどれも有意でなかったことから、ペントシジンレベルに対する残存腎機能の影響は、透析膜の種類によって影響されないと考えられる。

【0046】

【表5】

ペントシジンレベルの決定因子の変数選択一重回帰分析（変数増加法） （Forward stepwise multiple regression analysis）				
膜の種類	ペントシジン/蛋白		遊離ペントシジン	
	Rの増加 (increase in R)	P値	Rの増加 (increase in R)	P値
log(残存腎機能)	0.53	<0.001	0.59	<0.001
全蛋白	-0.21	<0.001	-0.36	<0.001
アルブミン	-0.17	NS	0.05	NS
年齢	-0.05	NS	-0.1	NS
血液透析の期間	0.12	NS	0.16	NS
	-0.01	NS	-0.08	NS

【0047】

6. 血液透析前後のペントシジンレベルに及ぼす透析膜の効果

透析前のペントシジンレベルに対して透析膜が効果を及ぼす機構をさらに解析するため、high-fluxポリスルフォン (Fresenius)、AN69、PMMA、またはlow-fluxセルロース透析膜を使った4群の患者に対し、透析前および後のペントシジンレベルを定量した(表6)。

【0048】

【表6】

一回の血液透析におけるペントシジンレベルに対する影響				
	PS n=14	AN69 n=15	PMMA n=9	セルロース n=28
ペントシジン/蛋白 (pmol/mg protein)				
前	14.6±6.2	25.4±8.4	24.3±8.5	21.8±6.4
後	13.8±6.6	23.4±5.6	22.8±8.3	22.1±5.8
遊離ペントシジン (pmol/ml)				
前	37.3±19.6	76.4±28.5	70.3±26	53.5±18.5
後	10.9±6.6	17.5±4.9	21.7±7	14.7±6.9
(減少率)(%)	(71±11)	(76±7)	(67±9)	(73±6)

【0049】

上記の実験により予想された通り、蛋白結合型ペントシジンはほとんど変化せず、また、透析膜の種類とも無関係であった。唯一、遊離ペントシジンが顕著に減少したが、その比率はすべての群で似ており、76% (AN69) から67% (PMMA) の間であった。グループ間に有意な差はなかった。従って、ポリスルフォン膜による透析患者で透析前のペントシジンレベルが低かったことを、透析膜の透析能力の差異によって説明することはできないことが判明した。

【0050】

本発明者は、以前、血液透析そのものは、全ペントシジンまたは蛋白結合型ペントシジンレベルに変更を与えないことを示した (Miyata T, et al. Kidney Int 51: 880-887, 1997)。この知見は、ペントシジンの95%は、透析で除去されないアルブミンと結合している (Miyata T, et al. J Am Soc Nephrol 7: 1198-1206, 1996) という事実に一致する。この知見は、上記の4つの異なる種類の透析膜で裏付けられた。これに対し、遊離ペントシジンは血液透析により減少し、すべての透析膜で似た現象が観察されたが、この結果は、遊離ペントシジンの分

子量 (379 Da) を考えれば予想されることである。血液透析の前後のペントシジンレベルが、すべての透析膜で同様であったことは、受動輸送だけでなく、ペントシジンの吸収も、ポリスルホンや他の透析膜による透析中に同様に起こっていることを示唆している。インビトロにおいて、放射性標識された遊離ペントシジンの吸収を測定したところ、吸収はセルロース膜およびポリスルホン膜ではごく僅かであり、事実上、差は認められなかった。

【0051】

従って、ポリスルホン膜によりペントシジンの除去が向上するということで、透析前のペントシジンの低レベルを説明することはできないと思われる。別の可能性としては、ポリスルホン膜による透析が、ペントシジン産生の抑制と係わっている可能性が考えられる。

【0052】

既に指摘したように、ペントシジンレベルは炭水化物に由来するカルボニル前駆体の濃度を反映している。ポリスルホン膜は、これらのカルボニル化合物の除去に特異的な効果を有しており、それによりペントシジン産生に効果を発揮している可能性がある。または、ポリスルホン膜は尿毒症に関連しているとされる酸化ストレスを減少させる可能性も考えられる (Miyata T, et al. *Kidney Int* 54: 1290-1295, 1998; Miyata T, et al. *Kidney Int* 51: 1170-1181, 1997; Loughrey CM, et al. *Q J Med* 87: 679-683, 1994; Ueda Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 785-790, 1998; Kumano K, et al. *Adv Perit Dial* 1992; 8: 127-130; Witko-Sarsat V, et al. *Kidney Int* 49: 1304-1313, 1996)。酸化ストレスの減少により、カルボニル化合物の産生が抑えられ、それによりペントシジンの生成が減少する可能性もある (Miyata T, et al. *Kidney Int* 51: 1170-1181, 1997)。

【0053】

7. ペントシジンレベルに及ぼす透析膜の変更の効果

ポリスルホン膜において特異的にペントシジンレベルが低くなる効果を確かめるため、長期間 (>5年) AN69による透析を受けている3人の無尿症患者についてlongitudinalな解析を行った。患者は10週間の間、同様の表面積を持つポリ

スルフォンの透析膜 (Fresenius) による透析に変更し、その後AN69に再変更した。PSへの変更の2週間前の透析前試料 (2試料)、PS透析期間中の透析前試料 (5試料)、およびAN69へ戻した後、14~16週の透析前試料 (2試料) を採取した。

【0054】

PSの透析へ変更後、各患者の蛋白結合型ペントシジンレベルは次第に減少し、AN69の透析へ戻した後は、PSに変更前のAN69使用時のレベルまで戻ることが判明した (図1)。

【0055】

AN69からPSによる透析に移行した患者の longitudinal な研究において観察されたペントシジンレベルの減少は、cross-sectional な研究において観察されたPS群とAN69群との間の違いの1/3に過ぎない (3.6 に対し 10.4 pmol/mg protein)。この相異は、PS透析移行による観察が、10週間しか行われなかったことによることが考えられる。ポリスルフォンが、ペントシジンの生成速度を減少させているとすれば、蛋白結合型ペントシジンの減少がこのように緩やかであったことも説明できると思われる。このような環境下では、蛋白結合型ペントシジンレベルの減少は、そのタンパク質の代謝によってしか起こらないと考えられる。同様の観察が、腎臓移植成功後においてもなされている。このとき、蛋白結合型ペントシジンの減少は、血漿 β 2ミクログロブリンの減少と比べ、非常にゆっくりとしか起こらず、蛋白結合型ペントシジンの崩壊が遅いことが示されている (Miyata T, et al. Kidney Int 51: 880-887, 1997; Hricik DE, et al. Clin Transplantation 10: 568-573, 1996)。

【0056】

【実施例2】 カルボニル化合物トラップ剤固定化担体による血中カルボニル化合物の除去

架橋したポリスチレン樹脂にスルホニルヒドラジン基を結合したもの (PS-TsNHNH₂, ARGONAUT TECHNOLOGIES社) をカルボニル化合物トラップビーズとして用いて、血中カルボニル化合物の除去効果を検討した。透析患者血漿及びカルボニル化合物トラップビーズを添加した透析患者血漿を37℃でインキュベートし、ペントシジンの形成抑制効果を確認した。カルボニル化合物トラップビーズの入っ

たチューブに、ジメチルスルホキシド100 μ l加え膨潤させた後、濾過滅菌した透析患者の透析前の血漿を添加し、37℃で1週間インキュベートした。インキュベート終了後、ポアサイズ0.22 μ mの遠心式フィルター（ミリポア製、UFC30GV00）を用いてビーズを除去した。つぎに、ビーズを除去した溶液50 μ lに10%トリクロル酢酸 50 μ lを加え、遠心してタンパク質を沈殿させた。タンパク質を300 μ lの5%トリクロル酢酸で洗浄し、乾固させた。つぎに、6N HClを100 μ l添加し、110℃で16時間加熱した後、HPLCでペントシジンを定量した（T. Miyataら, 1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206, T. Miyataら, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 2353-2358）。

【0057】

37℃でインキュベートしたときに生成するペントシジン量を図2に示した。カルボニル化合物トラップビーズの添加により、ペントシジンの生成が抑制されることが判明した。また、ペントシジンの生成の抑制は添加したカルボニル化合物トラップビーズの量に依存した。

【0058】

これらの結果から、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を用いて、血中のカルボニル化合物を除去できることが明らかとなった。また、血液透析膜としては、特にポリスルフォン膜が、カルボニルストレス状態の改善に好適であることが判明した。

【0059】

【発明の効果】

本発明によれば、血中のカルボニル化合物を効果的に取り除くことができる。本発明のカルボニルストレス状態改善剤は、血液透析用透析膜に固定化することにより、またはその他の担体に固定化して血液回路内に配置することにより簡単に実施することができる。これにより、腎不全患者等を苦しめていたカルボニル化合物による障害（カルボニルストレス）を改善することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

3人の患者における、血漿ペントシジンレベル（ μ mol/mg protein）に及ぼす血

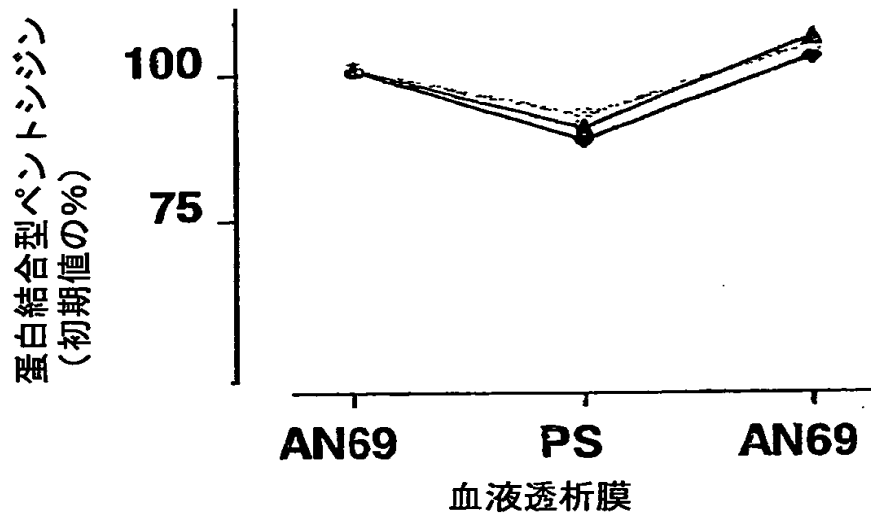
液透析膜の種類の変更の効果を示す図である。結果は初期値（患者1（◇）、患者2（□）、患者3（△）で、それぞれ41.8、22.1、28.5 pmol/mg protein）に対する％で表した。各値は各期間の最後に2週間の間隔をあけて採取された2サンプルの平均である（AN69で透析していた-2および0週目、PSに変更後の8および10週目、AN69に戻した後の14および16週目）。

【図2】

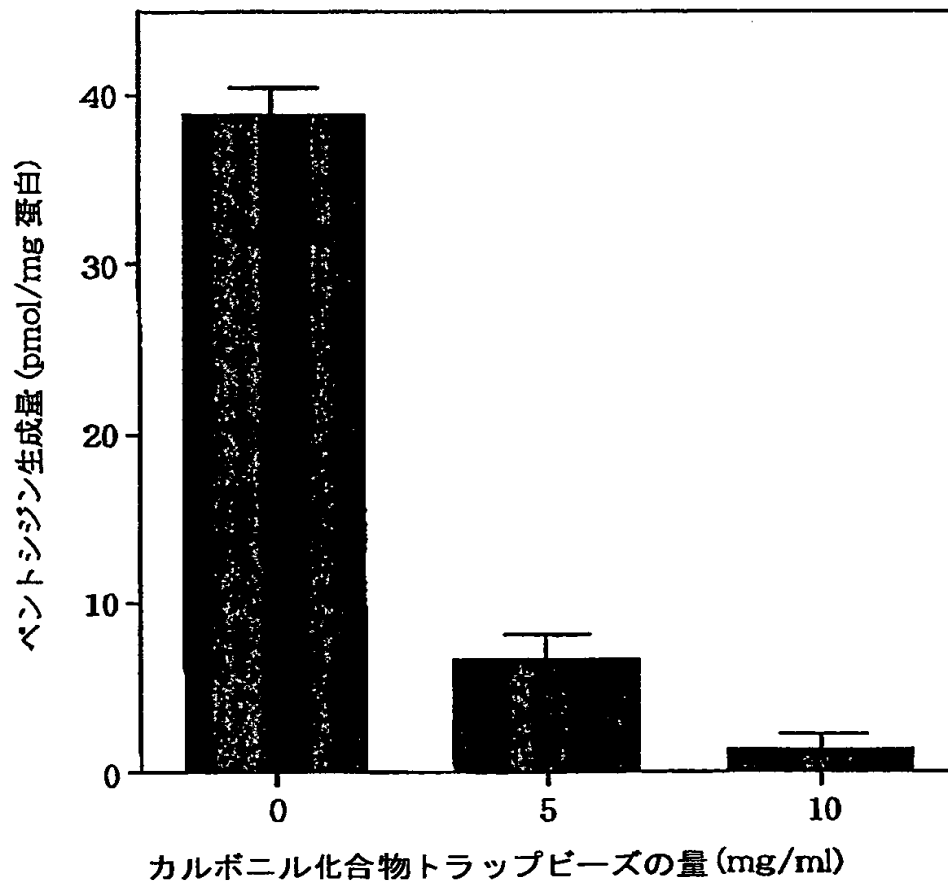
カルボニル化合物トラップ剤を固定化したビーズとのインキュベーションによる、透析患者血漿中のペントシジンレベルの抑制効果を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 血液透析患者のカルボニルストレス状態を改善する。

【解決手段】 カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を患者血液に接触させる。これにより、患者の血中に含まれるカルボニル化合物が効果的に除去され、カルボニル化合物による障害を軽減できる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597142376]

1. 変更年月日	1999年 2月10日
[変更理由]	住所変更
住 所	神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101
氏 名	宮田 敏男

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597142387]

1. 変更年月日 1997年 9月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401

氏 名 黒川 清